

20/108

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



**"ESTUDIO DE LA FRACCION TOXICA DE
SEBASTIANA PAVONIANA
EUPHORBIACEAE"**

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
AURORA REBOLLO TORRES



México, D. F.

**BOLETIN PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Página
INTRODUCCION	6
I .Parte Teorica	
Características de la familia <u>Euphorbiaceae</u>	8
Algunos estudios fitoquímicos realizados en plantas pertenecientes a la familia <u>Euphorbiaceae</u> 14
II. Parte Experimental	32
1. Pruebas de Identificación	32
2. Aislamiento del alcaloide	37
3. Tratamientos para confirmar la existencia de un compuesto proteico	50
III. Discusión de Resultados	62
IV. Conclusiones	65
V. Bibliografía	66

I N T R O D U C C I O N

Los venenos de flecha han sido conocidos por centurias en las culturas primitivas y en las tribus aborígenes asociados con sobrevivencia y brujería, éstos fueron usados en flechas y lanzas para paralizar mamíferos pequeños y aves .

En las áreas secas de Kenya, se han colectado la Adenia volkensii (2) que fué usada como veneno para hienas y para obtener venenos de flecha, encontrándose en su contenido un 90 a 95% de cianuros en toda la planta. También se ha estudiado que las plantas Erythro-
phleum sp., Voacanga sp., colectadas en Africa, fueron utilizadas también como venenos de flecha. De estas plantas se han aislado alcaloides que tienen efecto tóxico muy marcado, y otros compuestos diterpénicos que tienen actividad como glucósidos cardíacos. También hay plantas americanas que presentan alta toxicidad como es el caso del curare utilizado por los indígenas de América del sur. De la familia Euphorbiaceae, Sebastiania pavoniana fué reportada a principios del siglo como empleada por los indígenas de América para venenos de flecha, crece en el norte de México y lo que es el sur de los Estados Unidos Americanos .

La valoración de la actividad biológica del extracto del látex de Sebastiania pavoniana se llevó a cabo mediante la determinación de toxicidad aguda en ratones (CD-1) machos .El extracto se inyectó

por vía intraperitoneal. Los ratones se mantuvieron en observación durante 24 horas y al cabo de ese tiempo se determinó los que habían muerto a cada nivel de dosis. Mediante el uso de tablas de le_talidad se calculó la dosis letal media, que fué de 562 mg/Kg, con límites de confianza de 95% de 464 a 681 mg/Kg .

Se hizo un estudio semejante con el Residuo 2 de éste extracto, y la dosis letal media fue de 121 mg/Kg, con límites de confianza de 95% de 100 a 147 mg/Kg .

En ambas pruebas los ratones murieron presentando parálisis de las extremidades posteriores .

Estos resultados indican que el principio activo del látex de Sebastiania pavoniana se encuentra en mayor cantidad en el Residuo 2 .

Los síntomas que presentan los animales antes de morir sugieren que el mecanismo de muerte es una parálisis neuromuscular, lo cual es compatible con los datos obtenidos con otras euforbiáceas que se utilizan como venenos de flecha .

El objetivo de éste trabajo es el de poder establecer los grupos - funcionales que están presentes en la fórmula molecular o de ser posible proponer el tipo de estructura del compuesto responsable de la toxicidad que presenta el Residuo 2 .

I. P A R T E T E O R I C A

CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA EUPHORBIACEAE

La familia Euphorbiaceae constituye el orden de euforbiales, incluye alrededor de 300 géneros y sobre 7 300 especies. Está caracterizada principalmente por el notable desarrollo de vasos laticíferos, que pueden tener origen diverso.

Las Euphorbiaceae son hierbas, arbustos y árboles, algunos del género son muy grandes, tal es el caso de Phyllanthus, Euphorbia, Croton y Acalepha; pero la mayoría son monotípicas. Sus hojas casi siempre son esparcidas, generalmente estipuladas a veces de tallo suculento y afilo, las más veces provistas de vasos laticíferos, apóstivos o simplánticos, con las flores reunidas en inflorescencia en espiga, en racimo o en cuatróximo como acontece en el género Euphorbia, las flores son unisexuales monoficas o dioficas, actinomorfas; las flores masculinas con disco interestaminal, perianto reducido o nulo; estambres con número variable, libres o unidas en forma diversa; anteras biloculares deshiscentes en forma longitudinal o por poros apicales; ovario rudimentario o nulo. Las flores femeninas son en forma de disco anular y el ovario es tricarpelar, con tres estilos libres o unidos, semillas ovales de 1 a 2 centímetros de cavidad, en forma de péndulo. El fruto normalmente es una cápsula que se disgrega en tres cocos .

DISTRIBUCION .- Crece de Sonora a Nayarit, en San Luis Potosí, Michoacan, Guerrero, Puebla, Veracruz. En Yucatán existe la Sebastiana adenophora, en Tabasco la Sebastiana confusa y en Chiapas la Sebastiana longisquepic .

La Sebastiana pavoniana, con la cual se trabajó, fué colectada en Sinaloa, en el municipio de Agua Caliente .

NOBRES COMUNES .- Se le conoce como hierba o palo de la flecha , - con éste mismo nombre se designa al Sapium biloculare que crece en Sonora y Baja California y cuyos efectos son similares a los de Sebastiana pavoniana .

USOS .- En medicina popular se le ha atribuido la propiedad de ser un purgante; la infusión se hace poniendo un trozo de tallo en agua o leche durante unos minutos, pero su uso es peligroso ya que la planta es muy venenosa .

Los indígenas utilizaban el jugo, látex, para envenenar sus flechas una de sus acciones es de corroer la piel y causar hinchazones dolorosas .

En la tabla No.1 aparecen algunas drogas aisladas de plantas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae .

DISTRIBUCION .- Esta familia predominantemente es de distribución tropical,teniendo así fuertes concentraciones locales,como es la - región de Indomalasia junto con el trópico del continente Americano.

En regiones extratropicales se pueden encontrar en concentraciones ricas el género, en particular Euphorbia en el sur de los Estados - Unidos Americanos, el valle del Mediterráneo y el medio Este de Africa del sur; el género Croton se desarrolla en América del Sur - con alrededor de 300 especies sólo en Brasil.

En Africa del Sur y los otros dos trópicos reina en forma rica y variada, la familia Euphorbiaceae.

CLASIFICACION.- La familia puede dividirse en las siguientes grandes tribus:

Phyllanthae.- Phyllanthus ; Breynia.

Bridelieae .- Bridelia.

Crotoneae .- Coton ; Chrozophora ; Caperonia ; Mallotus ; Macaran
-ga ; Mercurialis ; Dalechampia.

Acalypheae .- Acalypha.

Ricineae .- Ricinus.

Jatropeae .- Jatropha ; Aleurites ; Manihot ; Codiaeum ; Ricino-
-dendron ; Hevea .

Suregadaeae .- Suregada .

Euphorbiae .- Hippomane ; Hura ; Sapium ; Sebastiana ; Euphorbia.

Algunos géneros tradicionalmente referidos a la familia de Euphorbiaceae recientemente han sido segregados de allí a otras familias, tal es el caso de Buxus que fué unido a la familia Buxaceae, y los géneros Pandi, Microdesmis, Galeari que fueron unidos a la familia Pandaceae. Otros géneros tratados con frecuencia en forma similar incluyen los géneros Aixtoxicon, Androstachys, Antidismi, Bischofia, Centroplacua, Daphniphyllum, Hymenocardia, Pera y Uapaca.

La familia Euphorbiaceae ha sido unida a otras familias, tales como Flacourtiaceae, Malvaceae y Urticaceae, pero éstas han sido estudiadas por autoridades competentes dándoles una importancia secundaria y separando el orden. Así pues, la familia tomó su nombre del género más numeroso, Euphorbia (éste no es un miembro de distribución tropical).

IMPORTANCIA ECONOMICA .- Un gran número de géneros constituyen las especies de considerable importancia económica, por ejemplo Hevea de Hevea brasiliensis, el árbol del hule, que es la fuente más importante de la producción mundial del hule natural; el género Manihot también está incluido como productor de hule, en especial M.gla siovii, pero es mejor conocido por la producción de mandioca, cassava o tapioca; la planta M.sculenta es fuente de alimento para la gente de muchos países tropicales.

El aceite de ricino proviene de Ricinus communis; Aleurites moluecane es la fuente del aceite de candelilla utilizado en la manufactura de ceras, pinturas y barnices; Vernicia es el género relacionado con Aleurites, éste comprende tres especies de las cuales se obtiene un aceite de valor comercial conocido como el aceite de tung unado en barnices y pinturas, El gran género Sapium sebiferum que es usado en la manufactura de ceras y velas; de las semillas del género Jatropha se obtiene un purgante muy drástico. Se han obtenido colorantes, para timbres, de color púrpura y azul de Mallotus philippinensis y Chrozophora tinctoria .

CARACTERISTICAS GENERALES DE SEBASTIANA PAVONIANA

MORFOLOGIA .- Es un arbusto de 2 a 2.5 metros de alto con hojas lanceoladas u ovales, de 4 a 11 centímetros, con flores apetaladas en forma de espiga delgada .

La semilla es invadida por la larva de una mariposa (Corpocapea saltans), la cual queda encerrada desde que es pequeña, sin que se note el orificio de entrada ni huella notable. Esta larva al sentir el calor se contrae bruscamente haciendo que la semilla salte , - " frijol saltarín " .

Droga	Parte usada	Origen botánico	Habitat
Cascarilla	Corteza	<u>Croton cluteria</u>	Oeste de India
Elastica (hule)	Látex preparado	<u>Hevea brasiliensis</u>	Brasil
Euphorbia pi- -lulifera	Hierba	<u>Euphorbia pilulifera</u>	India
Euphorbium	Resina del látex	<u>Euphorbia resinifera</u>	Marruecos
Kamala	Filamentos de - las cápsulas	<u>Mallotus phillippi- -nensis</u>	Asia
Aceite de - ricino	Aceites fijos	<u>Ricinus communis</u>	India
Aceite de - tigli	Aceites fijos	<u>Croton tiglium</u>	Asia
Estilingia	Raíces	<u>Stillingia sylvatica</u>	Sur de los Estados Unidos
Tapioca	Almidón	<u>Manihot sculenta</u> <u>Manihot aipi</u> <u>Aleurites cordati</u>	América del Sur Japón, China
Aceite de tung	Aceites fijos	<u>Aleurites fordii</u> <u>Aleurites montana</u>	Asia

Tabla No. 1 Drogas aisladas de plantas pertenecientes a la familia
Euphorbiaceae .

ALGUNOS ESTUDIOS FITOQUIMICOS REALIZADOS
EN PLANTAS PERTENECIENTES A LA FAMILIA EUPHORBIACEAE

Diversos compuestos del forbol han mostrado poseer actividad antitumoral. La actividad de éste grupo parece estar limitada a células de leucemia linfocítica P-388 "in vivo"; con una actividad no sustancial en otras leucemias o en sistemas tumorigénicos sólidos.

Es necesario hacer notar que los ésteres del forbol y derivados muestran toxicidad y están ampliamente distribuidas entre las plantas de la familia Euphorbiaceae; otros diésteres del forbol y compuestos relacionados con su toxicidad es de esperar que se encuentren en plantas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae. Es conveniente hacer notar que los diterpenos macrocíclicos del 6,20-epoxilathyrol; 7-hidroxilathyrol; bertiyidionol y jatrofano que han sido aislados de Euphorbia lathyris, Bertya sp. y Atropa gossypifolia (Euphorbiaceae), respectivamente, son compuestos diterpénicos de un sistema macrocíclicos de 5,11 ó 5, 12 miembros que probablemente sean precursores diterpénicos de un sistema de anillos de 5,7,6 miembros, ver figura No.1 .

Hecker y colaboradores investigaron el constituyente tumoral y la sustancia inflamatoria de Croton tiglium (Euphorbiaceae) y aislaron como principios activos 11 clases de 12,13-diésteres del forbol. También probaron otras plantas de la especie Euphorbia (Euphorbiaceae) como promotoras de tumores y de actividad inflamatoria, logrando aislar como principios activos 6 clases de ésteres de 12- desoxiforbol, 2 tipos de éster de 16- hidroxidesoxi forbol, y el éster de ingenol provenientes de Euphorbia triangularis, Euphorbia cooperi y Euphorbia ingens, respectivamente. (3)
(Fig. 2)

Se han encontrado en la familia Euphorbiaceae plantas que fueron utilizadas como piscicidas por nativos de zonas tropicales y sub tropicales. En la tabla No.2 se encuentran las plantas piscicidas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae.

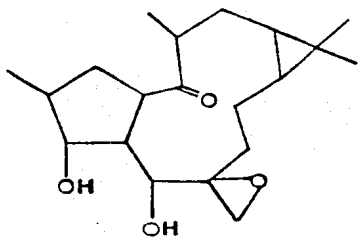
Los principios activos de plantas piscicidas hasta ahora aislados se mencionan en la tabla No 3 .

El género Euphorbia constituye el grupo numericamente más importante de la familia Euphorbiaceae ; de este destacan productos extraídos del látex en gran número triterpenos tetracíclicos: eufol, euforbol, tirucalol, artenol, cicloartenol, lanosterol, lanostenol, obtusifoldienol, parkeol, cicloeucanelol, y un cierto número de compuestos no identificados, que son derivados del eufeno y del lanostenol que en ocasiones se encuentran en el mismo látex (Fig. 3)

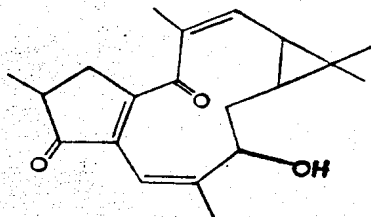
En estudios quimiotaxonómicos del género Euphorbia, por las investigaciones realizadas en el látex, se concluyó que contienen por lo menos 17 aminoácidos libres, salvo algunas excepciones y presentan una distribución bastante variable de n-alcanos en sus hojas. Se han aislado tres nuevos alcaloides derivados del imidazol de las hojas de plantas del género Glochidion (4), junto con el alcaloide conocido como N- α - cinnamoilhistamina.

Se estudiaron las especies: Glochidion philippicum, Glochidion novoguineensis y otras Glochidion sp.. Estos tres alcaloides son: glochidina, glochidicina y el N- - 4'-oxodecanoil histamina.

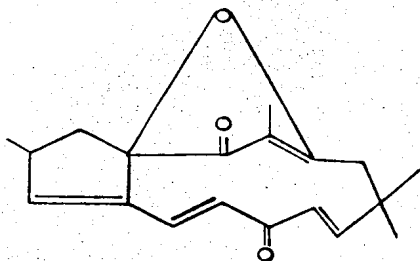
(Fig 4) .



6,20-epoxilathyrol

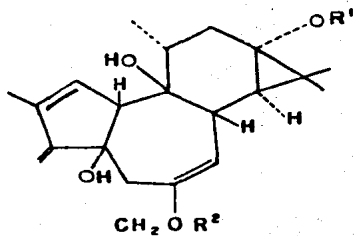


Bertydionol

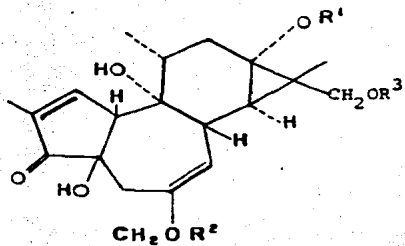


Jatrofano

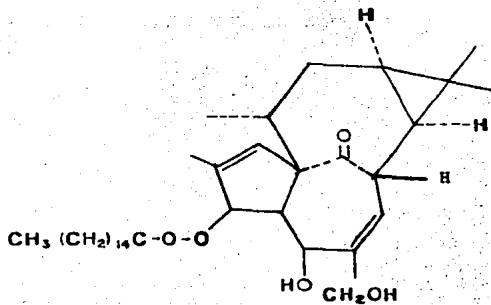
Figura No. 1



Ester 12-desoxi-ferbol

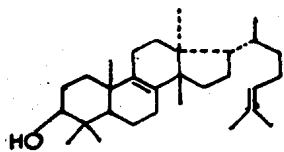


Ester de 16-hidroxi-12-desoxi-ferbol

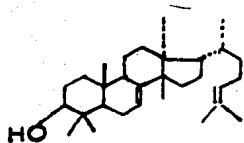


Ester de ingenol .

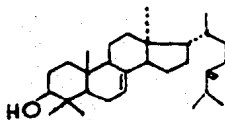
Figura No. 2



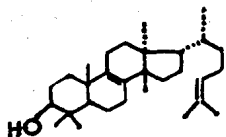
Eufol



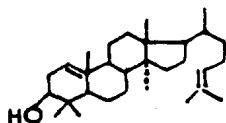
Butirospermol



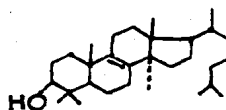
Euforbol



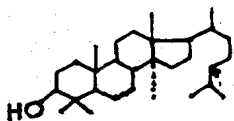
Tirucalol



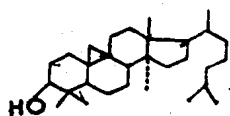
Lanosterol



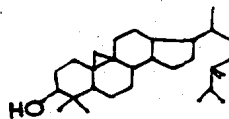
Lanostenol



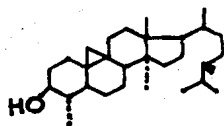
Obtusifoldienol



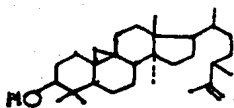
Cicloartenol



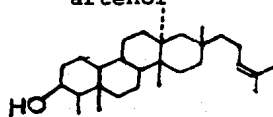
Metilen-24-ciclo-
artenol



Cicloeucalenol

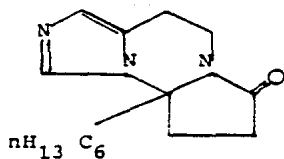


Ciclolaudenol

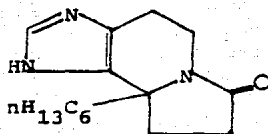


Shionol

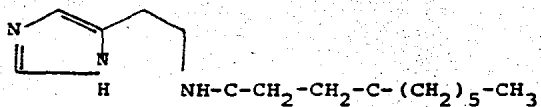
Figura No. 3



Glochidina



Glochidicina



N - - 4'-oxodecanoil histamina

Figura No. 4 Alcaloides del género Glochidion.

Familia Euphorbiaceae.

<u>Origen botánico</u>	<u>Parte utilizada</u>
<u>Alchornea parviflora</u>	Toda la plante
<u>Cleistanthus collinus</u>	Hojas
<u>Excoecaria agallocha</u>	Látex
<u>E. cochinchinensis</u>	Látex
<u>Euphorbia antiquorum</u>	Látex
<u>E. nerifolia</u>	Hojas
<u>E. tirucalli</u>	Látex
<u>E. trisoma</u>	Látex
<u>Hura crepitans</u>	Látex
<u>Jatropha curcas</u>	Semillas y látex
<u>Mallotus apelta</u>	Semillas
<u>M. philippinensis</u>	Látex
<u>Sapium indicum</u>	Fruto

Tabla No. 2 Plantas piscicidas .

Compuesto

Origen botánico

Rotenoides	Rotenoides, deguelina <u>Derris elliptica</u> ; eliptona, tefrosina <u>Tephrosia sp.</u> ; toxicarol, munduserona <u>Mundulea sericea</u> y pachirrizona <u>Pachyrrhizus erosus</u>
Cumarinas	Erosnina, pachirrizona <u>Pachyrrhizus erosus</u> ; Mammeina <u>Mammea americana</u> ; (+)-inofilolida y sus derivados <u>Calophyllum inophyllum</u> .
Ligninas	Difilina, colinusina y <u>Cleistanthus collinus</u> v cleistantina <u>Justicia procumbes</u> ; Justicidina A, justicidina B. <u>Justicia hatata</u> varie- -dad <u>decumbes</u> ; Justidicina A, B, C, D, E, F y difilina <u>Justicia procumbes</u> .
Terpenoides	Picrotoxinina, picrotina ... <u>Anamirta paniculata</u> ; calicarpona <u>Callicarpa candicans</u> ; ácido mangáyico <u>Callicarpa maindavi</u> ; hurotoxina <u>Hura crepitans</u> .
Poliacetilenos	Ichtiotereol y sus derivados. <u>Ichthyothere termi-</u> <u>nalis</u>
Alcaloides	Beberina, sepeerina, cissam- pereina y 4'-O-metilcurina isotrilobina <u>Cissampelos pareira</u> . (+)-tetrandina, fangochi- -nolina, isochodronendrina.. <u>Stephania hernandifo-</u> <u>lia</u>

Tabla No. 3 Constituyentes piscicidas y sus orígenes botánicos.

Del estudio fitoquímico de otras especies pertenecientes a la familia Euphorbiaceae, tales como Maprounea africana se aisló una sustancia idéntica a la cucurbitacina A . De la Maprounea membranaceae se logró aislar una mezcla parecida a la cucurbitacina A y la dihidro cucurbitacina A ; de la corteza del tronco de Spondianthus-preusii se han extraído unas sustancias análogas a la cucurbitacina L y la cucurbitacina E. Estos terpenos tetracíclicos fueron aislados de los extractos acetónicos de esas plantas y se realizaron diversas pruebas biológicas (5) . Una de estas pruebas fué la administración por vía intraperitoneal de una dosis de 0.2 mg/20 g en peso de ratones, del extracto acetónico. Después de realizar la prueba se observó un efecto purgante más o menos pronunciado. Otro síntoma que presento fue una alteración de inspiración profunda y periodos de respiración superficial .

La toxicidad de estos extractos está influida por la actividad laxante y el efecto en la velocidad de absorción y eliminación, pareciendo depender en forma primaria de otro género de actividad sin duda sobre el sistema nervioso. Se piensa en una intoxicación similar a la producida por la administración de estriquina, la muerte sobreviene a la 12 o 24 horas y parece deberse a un efecto sobre el sistema nervioso .

Con respecto a la relación estructura-actividad, se cree que el doble enlace en C₁-C₂ del anillo A no es determinante en la acción laxante y tóxica , por el contacto el grupo acetilado en la -

cadena lateral en C₂₅ favorece la acción laxante pero con una disminución de la toxicidad. Cuando el doble enlace se encuentra en C₂₃ - C₂₄ de esta misma cadena se aumenta en forma notable su actividad laxante y tóxica.

También se ensayó la actividad citotóxica, sobre un cultivo de células HELA y se observó la muerte de las células a una concentración de 0.1 mg/ ml de dicho extracto.

La causa de esta actividad citotóxica es debida a un efecto sobre la respiración de las células tumorales y sobre la permeabilidad celular.

Así pues, los resultados son aleatorios y pueden dar lugar a agentes antitumorales potenciales . (En la figura No5 se muestran - las estructuras de las cucurbitacinas) .

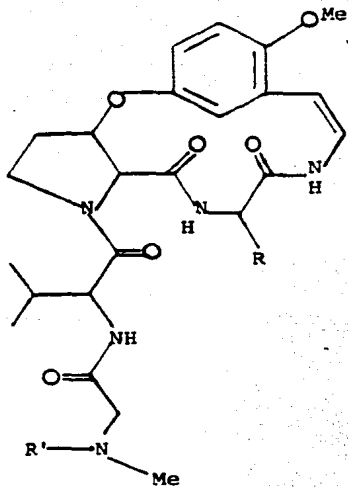
En Pakistán se ha usado en la medicina tradicional, unas plantas de la familia Rhamnaceae a las que se les atribuyen cualidades para curar bronquitis y tratar úlceras y heridas. La planta es un árbol de 5-6 m de altura y del que se usa según la especie, el fruto o la corteza .

Del extracto de estas plantas se obtiene una fracción cruda de carácter básico que contiene alcaloides ciclopeptídicos que han formado una familia de compuestos con una estructura básica, que contiene grupos aromáticos y después aminoácidos formando la cadena peptídica en la que se han identificado : hidroxifenil alanina , -fenil alanina, N,N dimetil valina y leucina, aunque pueden haber variación en los aminoácidos, y además puede encontrarse una fracción que es p-hidroxiestirilamina .

Entre las plantas estudiadas (9-14) se encuentran :

Zizyphus nummularia, Zizyphus sativa, Zizyphus mucronata, Ceanothus intigerrimus y Scutia buxifolia , todas ellas pertenecientes a la familia Rhamnaceae .

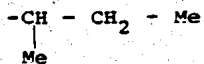
De estas plantas se han extraído y caracterizado muchos compuestos algunos de ellos se muestran en las figuras No.6-10 .



R

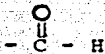
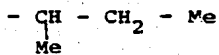
R'

Sativanine-C

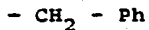


H

N-Formylsativanine-C



Nurrularine- B

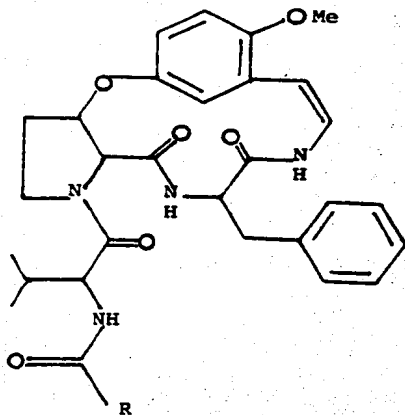


H

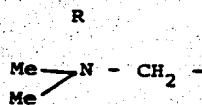
Aislados de Zizyphus sativa, Rhamnaceae .

Figura No. 6

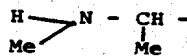
Figura No. 7



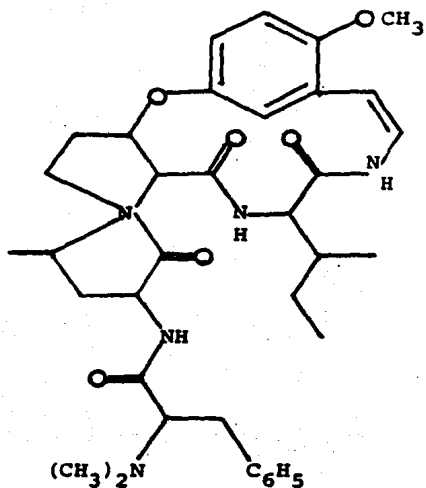
Nummularine-N



Nummularine-B



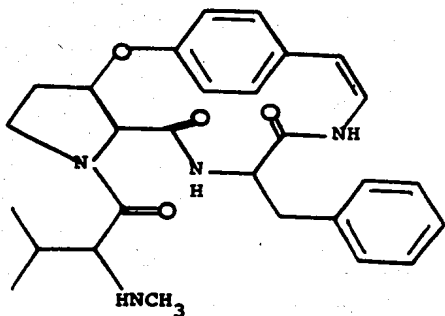
Aislados de Zizyphus nummularia, Rhamnaceae .



Mucronin-D

Aislado de Zizyphus mucronata, Rhamnaceae .

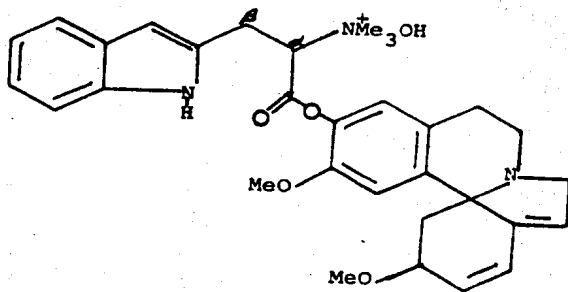
Figura No. 8



Mauritin-C

Aislado de Ziziphus mauritania, Rhamnaceae .

Figura No. 9



Erysodinophorine.

Aislado de Erythrina arborescens, Leguminosae.

Figura No. 10

II . P A R T E E X P E R I M E N T A L

El material usado para este trabajo fue obtenido por C. Hidalgo y C. Hunken (1) mediante un esquema de extracción que se reproduce en el esquema No. 1

Como puede observarse en ese esquema hay una fracción denominada Residuo 2 al que se le hicieron pruebas de solubilidad para determinar si la mezcla representa un péptido o un compuesto muy polar de tipo alcaloide.

PRUEBAS DE IDENTIFICACION

a) SOLUBILIDAD

La fracción denominada residuo 2 fué insoluble en la mayoría de los solventes orgánicos (hexano, acetato de etilo, cloroformo, metanol, etc.) solo pudo solubilizarse en un buffer de tris-fosfatos pH= 5

b) PRUEBAS PARA IDENTIFICACION DE ALCALOIDES

1.-Con el reactivo de Dragendorff. El cual se prepara de la siguiente manera:

i) Solución de yodo bismuto. i') solución concentrada de nitrato de bismuto ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$), la solución se prepara por disolución de 50 g de subnitrato de bismuto en 70 ml de ácido nítrico (1:1) y se diluye a 100 ml con agua. ii) Se disuelve 1.25 g de yoduro de potasio

en 4.5 ml de agua y se añade 0.5 ml de la solución concentrada de nitrato de bismuto.

Solución diluida de ácido sulfúrico (1:3) y 0.5 ml de la solución concentrada de nitrato de bismuto, forman el reactivo de Dragendorff. Se pone una gota del extracto a probar en una placa excabada y se agrega una gota del reactivo, sin agitar, si se observa un precipitado de color naranja la prueba es positiva para alcaloides.

La reacción de Dragendorff fué positiva para el residuo 2

2. - Método de Mayer, el reactivo se prepara de la siguiente manera:

Separadamente se disuelven 1.35 g de cloruro mercurico en 60 ml de agua y 5 g de yoduro de potasio en 10 ml de agua. Se mezclan las dos soluciones y se diluye con agua hasta 100 ml .

Se pone una gota del extracto a probar en una placa excabada y se agrega una gota del reactivo, sin agitar, si se observa un precipitado de color naranja la prueba es positiva para alcaloides.

La reacción de Mayer fué negativa para el residuo 2.

c) REACCIONES PARA IDENTIFICACION DE PROTEINAS

1. - Con el reactivo de Biuret.

Para preparar el reactivo, se disuelven 1.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 6 g de tartrato doble de sodio y potasio tetrahidratado en 500 ml de agua destilada. Adicionar 300 ml de hidroxido de sodio al 10% , libre de carbonatos, y aforar a un litro con agua destilada.

A 1 ml del extracto a probar se agrega 4 ml del reactivo de Biuret se deja reposar 30 minutos y sí se produce un color azul violeta es positiva para proteínas.

La prueba de Biuret para el residuo 2 fué positiva.

2. - Reacción con Ninhidrina

Se uso el reactivo en spray, de Sigma, para revelar las placas de cromatografía de capa fina produciendose una coloración amarillo-anaranjado cuando la prueba es positiva, como en el caso del residuo 2.

Método de Ninhidrina en solución

El reactivo se prepara de la siguiente manera:

Solución A.- se pesan 0.008 g de SnCl_2 y se disuelven en 5 ml de buffer de citratos 0.2 M de pH=3

Solución B.- se pesan 0.2 g de ninhidrina y se disuelven en 5 ml de eter monometílico de etilenglicol (2-metoxietanol, monometilglicol).

Se mezclan las soluciones A y B, en proporciones 1:1 y por cada 25 μl de la fracción a probar se le agrega 1 ml del reactivo de ninhidrina, se agita con ayuda de un Vortex y después se calienta hasta ebullición durante 20 minutos; se enfria la solución y se diluye con 5ml de una mezcla de propanol y agua en partes iguales, produciendo el color anaranjado, para una prueba positiva.

Para el residuo 2 fué positiva esta prueba.

3.- Método de Lowry.

Se usa para detectar la presencia de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano) en cantidades pequeñas.

Los reactivos son :

Solución A: Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio al 0.1N

Solución B: Sulfato de cobre al 1%

Solución C: Tartrato de sodio y potasio al 2%

Solución D: Mezclar volúmenes iguales de solución B y C, al momento de usarla .

Solución E: Por cada 50 ml de la solución A, se agrega 1 ml de la solución D , esta solución se prepara antes de usarla

Solución F: Mezclar 3 ml del reactivo de Folin-ciocaltau (Merck) en 4.5 ml de agua.

Para 200 μ l de la muestra se agregan 4 ml de la solución E; se mezcla y se deja reposar 10 minutos, después se le añade 0.4 ml de la solución F, agitando, y se deja reposar 30 minutos, al cabo de este tiempo, se desarrolla un color amarillo si es positiva la prueba .

La prueba de Lowry para el residuo 2 fué positiva.

Materia prima: Látex de
Sebastiania pavoniana

Etanol-Cloroformo

FILTRADO 1

RESIDUO 1

Etanol

Hexano
Metanol-Eter

Filtrado 2

Residuo 2

Filtrado A

Residuo A

Benceno

Acetona

Semisólido

Filtrado B

F-R-1

Residuo B

Acetona

F-R-1'

R-li

R-lii

R-liii

R-liv

R-1v.

Esquema No. 1 .

AISLAMIENTO

METODOS PARA AISLAR UN ALCALOIDE .

1. - A 1g de la fracción llamada Residuo 2 se le agrega 18 ml de ácido sulfúrico 0.1N y 1 ml de solución de hidróxido de amonio al 25%. La solución acuosa se extrae con acetato de etilo durante 24 horas usando un extractor líquido-líquido en continuo.

Se procede a separar la fracción orgánica y después de secar el acetato de etilo sobre sulfato de amonio anhidro, se dejó en reposo apareciendo un precipitado blanco, denominado A-5, soluble en metanol y da la reacción de Dragendorff negativa .

Se hace una mezcla de hexano-acetato de etilo (1:1) con lo que se extrae la fase acuosa, usando embudos de extracción. La fase orgánica se reduce de volumen por destilación al vacío. Al concentrado se le agrega metanol obteniéndose un precipitado amorfo al cual se le denominó A-6 (Esquema No. 2) .

A esta fracción A-6, se le hicieron pruebas de Dragendorff, Ninhidrina y Biuret, siendo positivas todas ellas; además de las pruebas de color se hizo un espectro de infrarrojo, obteniendo las siguientes bandas: 3300 cm^{-1} (OH Y NHR asoci.); 1670 cm^{-1} (C=O conjugado) Esquema de Infrarrojo No. 1

Para el mejor manejo de la fracción denominada A-6 se formó el acetato, de la siguiente manera:

La fracción A-6 se coloca en un matraz redondo y se le agregan 2ml

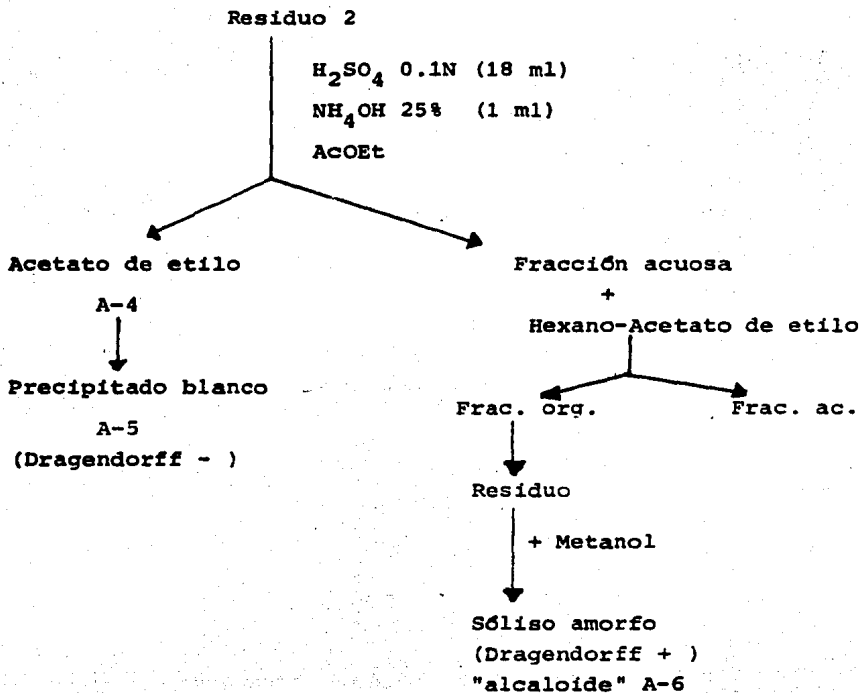
de piridina y 4 ml de anhídrido acético; la mezcla se agita continuamente y a temperatura ambiente, se deja durante 72 horas. Se procede a quitar el exceso de anhídrido acético añadiendo metanol y destilando la mezcla al vacío hasta casi sequedad, después se agrega benceno y también se destila al vacío para arrastrar la piridina en exceso. El producto obtenido se le denominó A-7, dando reacciones negativas para Dragendorff y ninhidrina. A éste derivado se le hizo espectro de infrarrojo, obteniendo las siguientes bandas: 3320 cm^{-1} (-NHR asoc.); 3100 cm^{-1} (overtone -NHR arom.); 1750 cm^{-1} (C=O de éster); 1670 cm^{-1} (C=O conj.); 1241 cm^{-1} (C-O éster); 1050 cm^{-1} (C-N). (Esquema de I.R. No.2)

2. - En éste método la primera extracción se hace igual que en el procedimiento 1 y la diferencia estriba en que la fracción acuosa obtenida se liofiliza, obteniendo un residuo al que se le agregan 10 ml de éter, obteniendo un aceite amarillo, el cual da prueba positiva de Dragendorff (Esquema No.3).

3. - Otro método utilizado para aislar alcaloides es el descrito por E. Stahl. (6) (Esquema No.4).

A 0.1 g del Residuo 2 se agita por un minuto con 5 ml de una mezcla de ácido sulfúrico y agua, en partes iguales, después de filtrar se obtiene un precipitado que da prueba negativa de Dragendorff.

Al filtrado se le deja en reposo, obteniéndose una suspensión , que se le agrega 1 ml de hidróxido de amonio al 25 %, dando una solución que se le agrega agua dando nuevamente una suspensión después se hace una extracción con embudos de separación usando éter, obteniéndose una fracción acuosa concristales, que da levemente positiva a la reacción de Dragendorff; la fase éterea da - ésta prueba claramente positiva, a la cual se le añade metanol dando un precipitado con prueba de Dragendorff positiva.



Esquema No. 2

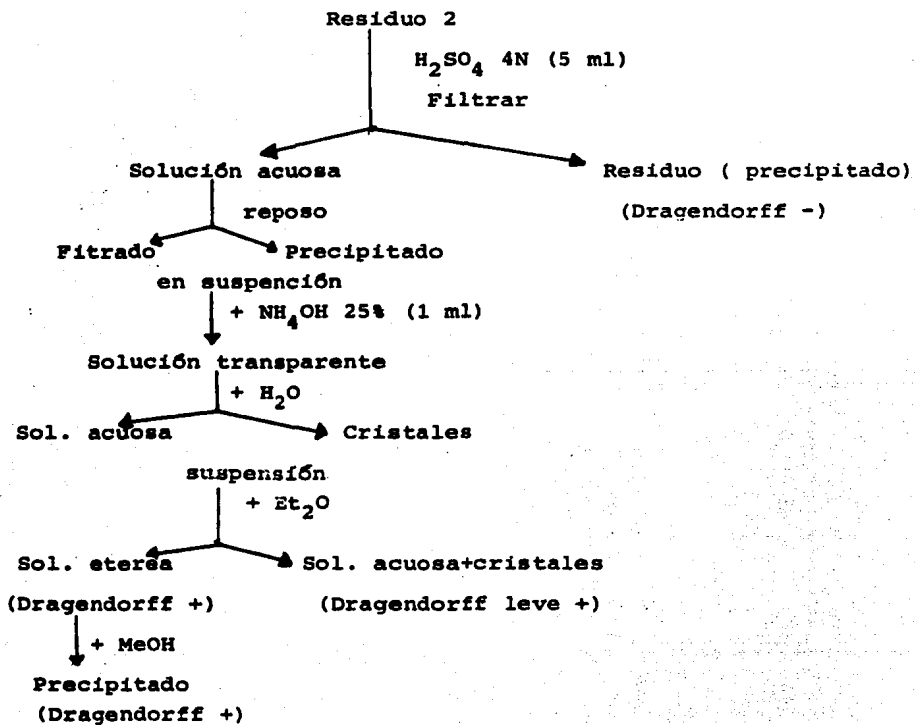
Residuo 2

H_2SO_4 0.1N (15ml)
 NH_4OH 25% (0.1ml)
AcOEt (24 horas)

Precipitado amorfo
(Dragendorff -)

Solución acuosa
 Et_2O Liofilización
 $(NH_4)_2SO_4$
Fracción orgánica
(Dragendorff +)

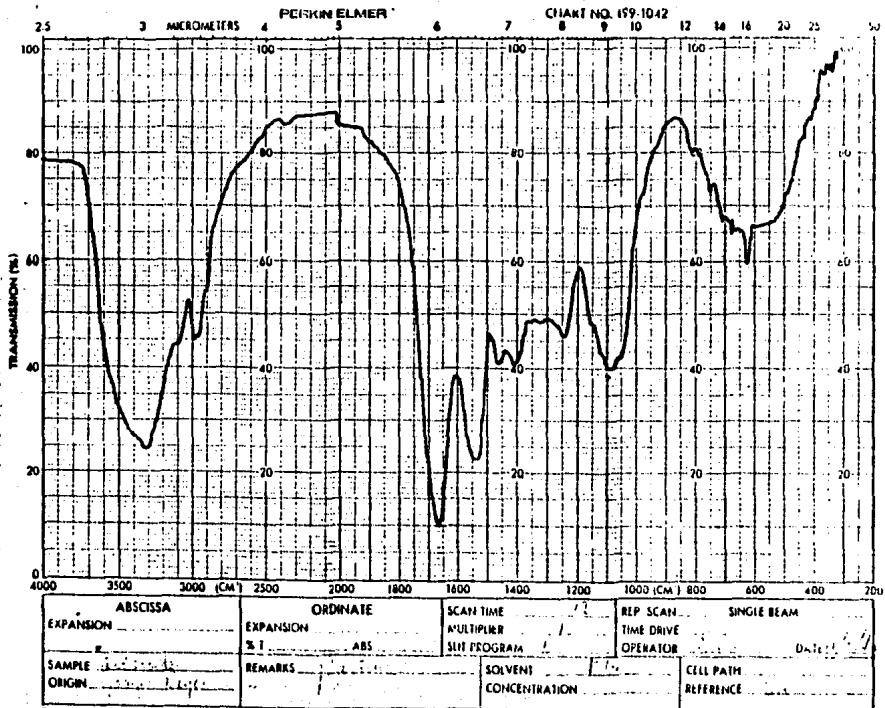
Esquema No. 3



Esquema No. 4

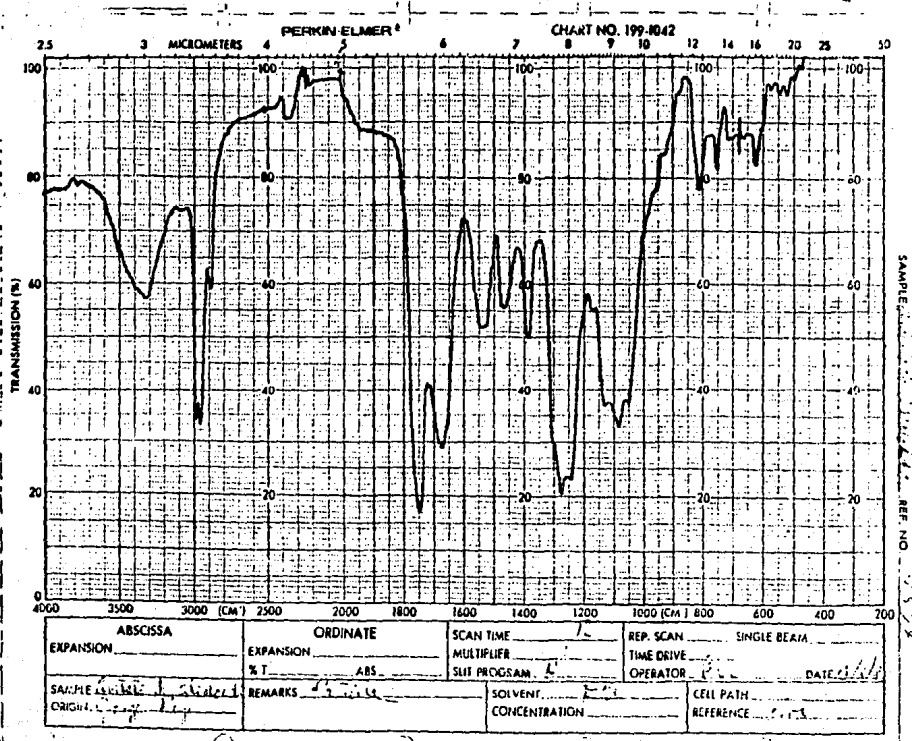
ESQUEMA DE INFRARROJO NO. 1 .

43



SAMPLE REF NO

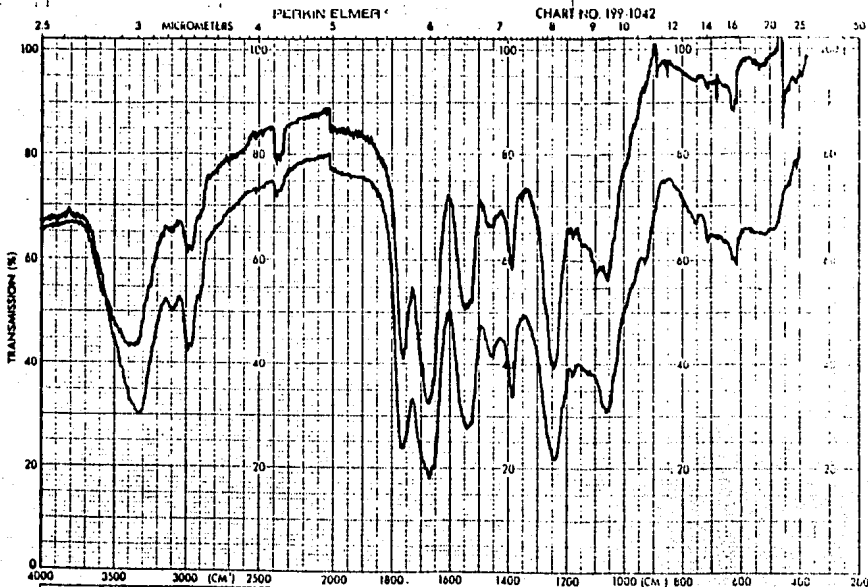
ESQUEMA DE INFRARROJO No. 2 .



SAMPLE NO. 199-1042 REF. NO.

ESQUEMA DE INFRAROJO NO. 2 .

44



ABSCISSA	ORDINATE	SCAN TIME <i>11</i>	REP SCAN
EXPANSION _____	EXPANSION <i>2.1</i>	MULTIPLIER _____	SINGLE BEAM
SAMPLE 1 _____	% I <i>ASS</i>	 slit PROGRAM <i>1</i>	TIME DIV _____
ORIGIN _____	REMARKS _____	SOLVENT <i>1</i>	OPERATOR _____
		CONCENTRATION _____	CELL PATH _____
			REFERENCE _____

TRATAMIENTOS PARA CONFIRMAR LA EXISTENCIA DE UN COMPUESTO PROTEICO

1. - HIDROLISIS ACIDA

A 100 mg del llamado residuo 2 se le agrega 1 ml de ácido clorhídrico 1.5 N y se calienta hasta reflujo con agitación continua. Después de 5 horas se hizo un control por cromatografía de capa fina, comprobando que el aducto parecía inalterado.

2. - HIDROLISIS ACIDA A PRESION

En una ampollita se pone 10 mg del residuo 2, al que se le agrega 1 ml de HCl 6N, después de cerrar la ampollita se calienta en un baño de aceite hasta temperatura de 110°C durante 24 horas. Al cabo del tiempo, se deja enfriar la ampollita hasta la temperatura ambiente y después de abrirla, al contenido se le agrega 1 ml de HCl 0.1N. La mezcla de reacción se analizó por cromatografía de capa fina, mostrando un barrido, con manchas, usando n-butanol-ácido acético-agua (4:1:5) como eluyente y revelando con ninhidrina. (Fig. 1).

3. - HIDROLISIS ENZIMATICA

El uso de enzimas proteolíticas fue para comprobar que la hidrólisis se lleva a cabo en los enlaces peptídicos y que la reacción no se lleva a cabo en grupos químicos de otra naturaleza.

Las enzimas que se usan para las hidrolisis son :

- | | |
|-------------------------------|-------------|
| 1) α y β amilasa | con pH= 7 |
| 2) Lisozima | con pH= 7 |
| 3) Celulicina | con pH= 5.5 |

El procedimiento que se siguió para la hidrólisis, se describe en forma general y es necesario aclarar que fue usado con cada una de las enzimas.

En un tubo de ensaye se colocan 100 mg de residuo 2 agregandole - 0.5 ml de una solución al 1% de la enzima, en trisfosfatos pH=7. El tubo se calienta en baño maría a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Al contenido del tubo se le agrega cloroformo, extrayendo la fase orgánica, que fue analizado por cromatografía de capa fina y que se desarrolla en benceno-acetato de etilo(7:3), como eluente, observando el desplazamiento de varias manchas después de revelar con ninhidrina. (Fig. 2).

4. - Debido a que el procedimiento anterior se observa que la hidrólisis con lisozima es la que produce mejores resultados, se procede a repetir la técnica, con la diferencia de que la enzima se disuelve y se mantiene con agitación durante 8 horas, antes de usarla .

Para llevar a cabo la hidrólisis, en un tubo de ensaye se colocan 20 mg del residuo 2, agregandole 2 ml de buffer trisfosfatos pH=7 y a esta mezcla se agregan 2 ml de la solución que contiene la enzima y se deja el tubo en baño maría durante 48 horas a temperatura de 37°C.

Después se hace una extracción con cloroformo y se aplica en una placa de cromatografía de capa fina, que se desarrolla en ciclo -

hexano-acetato de etilo (9:1), obserbandose manchas bien separadas cuando se revela con ninhidrina. (Fig. 3) .

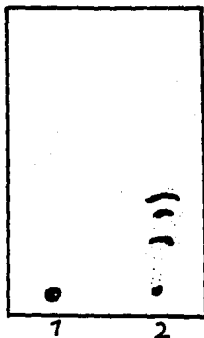


Fig. No.1

1

2

Soporte:Gel de sílice GF₂₅₄

1 : Residuo 2

2 : Producto de hidrolisis del residuo 2

Eluente :n-butanol-ácido acético-agua (4:1:5)

Revelado : Ninhidrina.

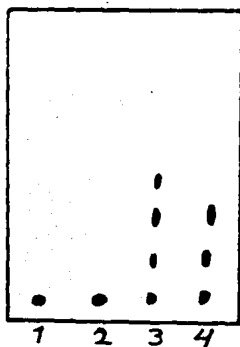


Fig. No. 2

Soporte : Gel de sílice GF₂₅₄

1 : Residuo 2

2 : Residuo 2 + y amilasa

3 : Residuo 2 + lisozima

4 : Residuo 2 + celulicina

Eluente : benceno-acetato de etilo (7:3)

Revelado : Ninhidrina .

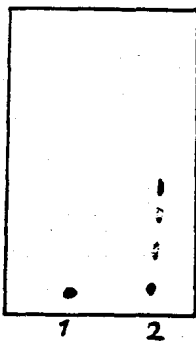


Fig. No. 3

Soporte : Gel de sílice GF₂₅₄

1 : Residuo 2

2 : Residuo 2 + lisozima

Eluente : ciclohexano-acetato de etilo (9:1)

Revelado : Ninhidrina .

AISLAMIENTO DEL PEPTIDO

Con el objeto de aislar el péptido, se usaron columnas de Sephadex, además de intentar conocer el peso molecular del péptido, - en función del tamaño de partícula usado.

Se preparan 3 columnas, usando Sephadex G-25, G-75 y G-150 con solución beffer trisfosfatos pH= 7 y calibradas con azúll de dextrana. El tubo para cargar el Sephadex fue de 0.7 cm de diámetro por 20 cm de longitud en cada caso.

1.-) COLUMNA SEPHADEX G-25

Se hace una solución del Residuo 2 (2.5 mg) en buffer (trisfosfatos pH= 7) para obtener su absorbancia en un espectrofotometro - de UV/VIS a longitud de onda de 230 y 280 obteniendo 1.4 y 1.3 D.O. respectivamente. La misma solución se aplica a la columna y se eleye con el mismo buffer que se emplea para cargar la columna, obteniendo 13 fracciones con su correspondiente absorbancia que se muestra em la tabla 1 y la gráfica No. 1

2.-) COLUMNA SEPHADEX G-75

Se hace una solución del Residuo 2 (5.0 mg) en 1ml de buffer (- trisfosfatos pH= 7) para obtener su absorbancia en un espectrofotometro de UV/VIS a longitud de onda de 230 y 280, para lo cual so tomó una alicuota, 0.1, de está solución, aforando a 1.0 ml

para obtener su absorbancia de 0.61 D.O. y 0.5 D.O. para 230 y - 280 respectivamente. La primera solución (5.0 mg del Residuo 2/ml buffer) se aplica a la columna y se eluye con el mismo buffer - que se emplea para cargar la columna, obteniendo 19 fracciones con su correspondiente absorbancia que se muestra en la tabla 2 y la gráfica No.1

3.-) COLUMNA SEPHADEX G-125

Se hace una solución de Residuo 2 (10.0 mg) en 1 ml de buffer (- trisfosfatos pH= 7) para obtener su absorbancia en un espectrofotometro de UV/VIS para lo cual se toma una alícuota ,0.1 ml, de está solución, aforando a 1.0 ml, obteniendo su absorbancia de 1.2 D.O. y 1.02 D.O. a 230 y 280 respectivamente. La primera solución (10.0 mg de Residuo 2/ml de buffer) se aplica a la columna y se eluye con el mismo buffer que se emplea para cargar la columna, - obteniendo 36 fracciones con su correspondiente absorbancia que se muestra en la tabla 3 y la gráfica No. 2 .

Para confirmar que cantidad del péptido existe en el Residuo 2, a partir de las fracciones obtenidas en la columna de Sephadex G-25, se hicieron las reacciones de Lowry y Ninhidrina como se describen en las pags. 34-35 después de hacer una curva estandar de albúmina leyendo la absorbancia a 750 nm. .

METODO DE LOWRY

Las lecturas obtenidas son :

TUBO	μg de Albumina	μl de las fracciones obt. de la columna Sephadex G-25	Absorbancia
1	H ₂ O	--	--
2	Reactivos	--	0.005
3	10	--	0.03
4	20	--	0.08
5	30	--	0.10
6	40	--	0.115
7	60	--	0.19
8	80	--	0.26
9	T ₂	50	0.078
10	T ₂	100	0.17
11	T ₃	50	0.08
12	T ₃	100	0.17
13	T ₄	100	0.09

Después de graficar estos datos, de la curva estandar, (Gráfica 3) se interpolan las lecturas problemas obteniendo 53, 53 y 29 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ para los tubos 2, 3 y 4 respectivamente .

METODO DE NINHIDRINA

Las lecturas obtenidas son:

TUBO	μg de Albúmina	μl de las fracciones obt. en la columna Sephadex G-25.	Absorbancia
1	H ₂ O	--	--
2	buffer	--	--
3		20	0.1
4		40	0.12
5		80	0.315
6		120	0.470
7	T ₂	190	0.23
8	T ₃	190	0.075
9	T ₄	190	0.012

Se interpolaron los resultados de los problemas en la gráfica 4 y se obtubieron 30, 10 y 6.0 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ para los tubos 2, 3 y 4 respectivamente .

TABLA No. 1 Sephadex G-25

TUBO	VOLUMEN (ml)	λ_{230}	λ_{280}
1	3	0.148	0.072
2	1	1.145	0.800
3	1	1.695	0.548
4	1	0.749	0.142
5	1	0.575	0.135
6	1	0.399	0.137
7	1	0.275	0.137
8	1	0.130	0.046
9	1	0.120	0.056
10	1	0.080	0.022
11	1	0.079	0.046
12	1	0.044	0.008
13	1	0.052	0.014

TABLA No. 2 Sephadex G-75

Tubo	VOLUMEN (ml)	λ_{230}	λ_{280}
1	4.3	$\gg 2$	0.98
2	1	3.08	2.93
3	1	3.55	1.05
4	1	0.56	0.542
5	1	1.98	0.860
6	1	0.735	0.223
7	1	0.300	0.150
8	1	0.21	0.090
9	1	0.142	0.064
10	1	0.165	0.110
11	1	0.280	0.215
12	1	0.082	0.034

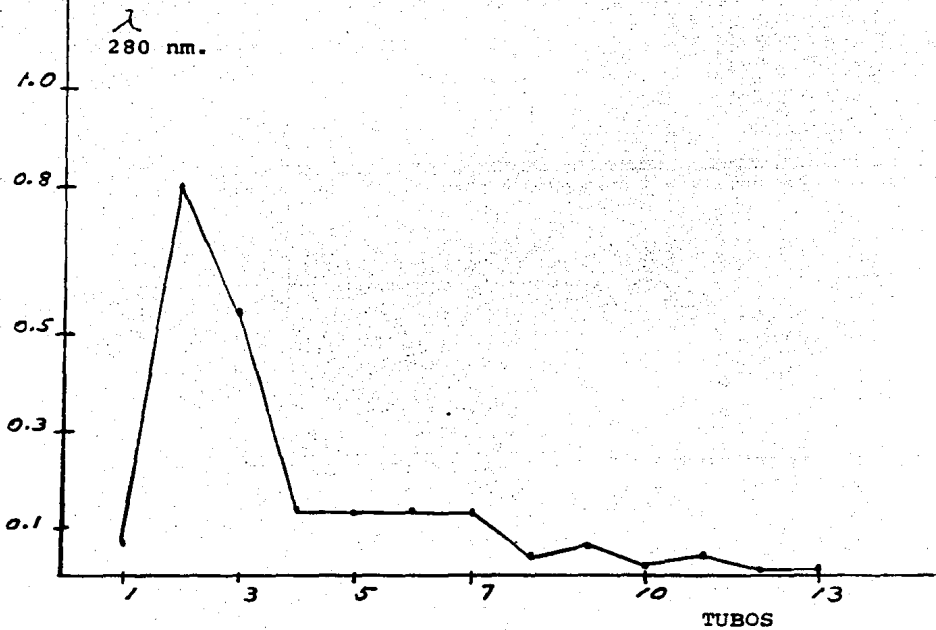
TUBO	VOLUMEN (ml)	λ_{230}	λ_{280}
13	1	0.108	0.064
14	1	0.072	0.028
15	1	0.15	0.060
16	1	0.080	0.038
17	1	0.030	0.010
18	1	0.128	0.084
19	1	0.086	0.042

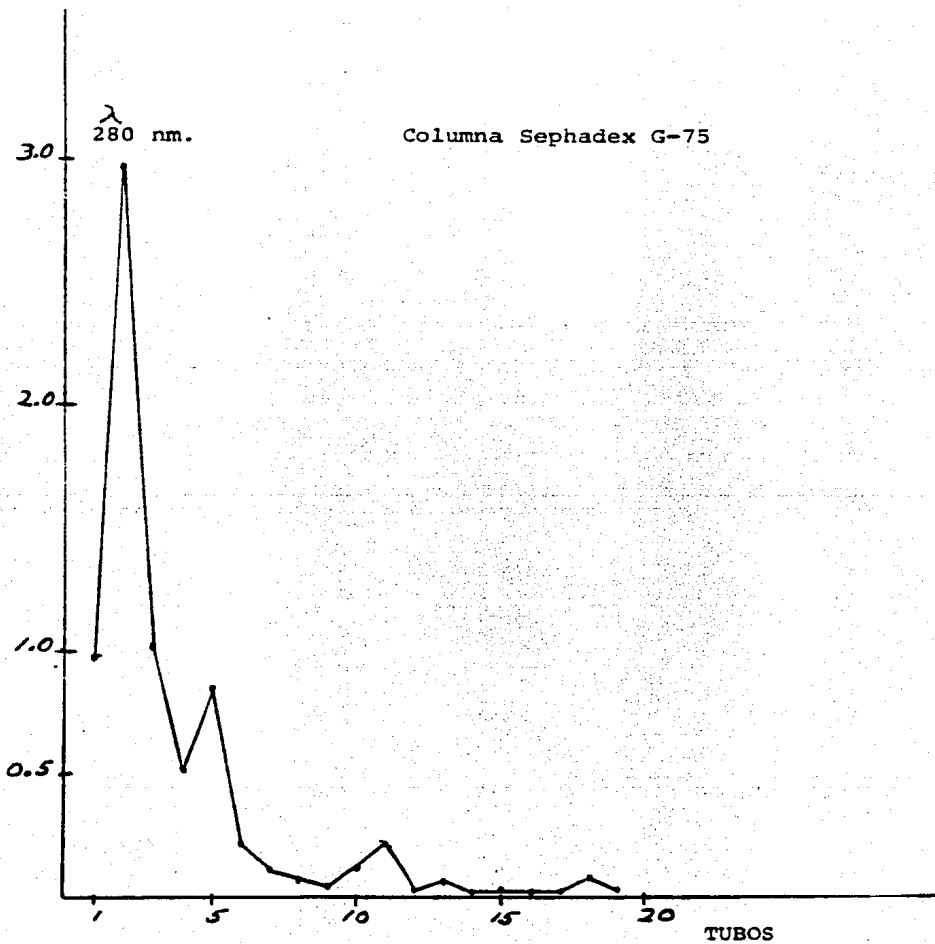
TABLA No. 3 Sephadex G-150

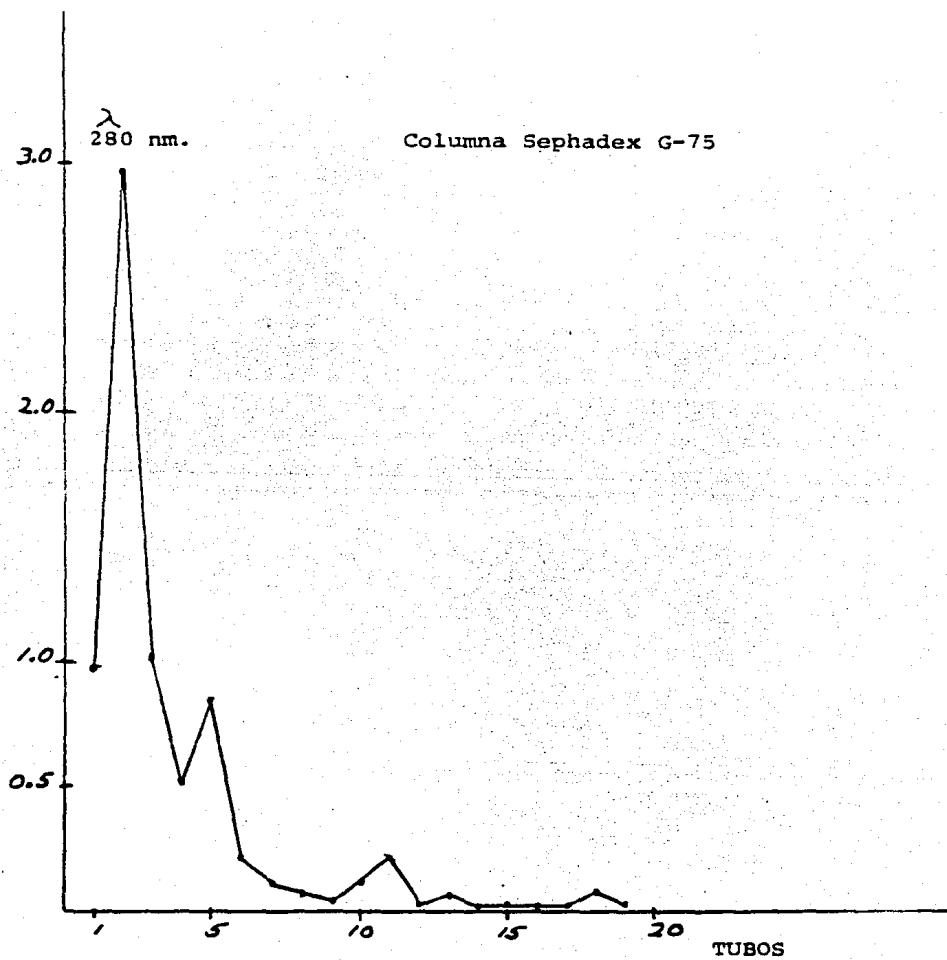
TUBO	VOLUMEN (ml)	λ_{230}	λ_{280}
1	10	0.400	0.245
2	1	0.500	0.365
3	1	0.620	0.550
4	1	0.740	0.740
5	1	0.820	0.735
6	1	0.605	0.555
7	1	0.700	0.570
8	1	0.325	0.315
9	1	0.520	0.425
10	1	0.790	0.605
11	1	0.350	0.350
12	1	0.260	0.295
13	1	0.280	0.300
14	1	0.305	0.340
15	1	0.315	0.330
16	1	0.250	0.290
17	1	1.03	0.780

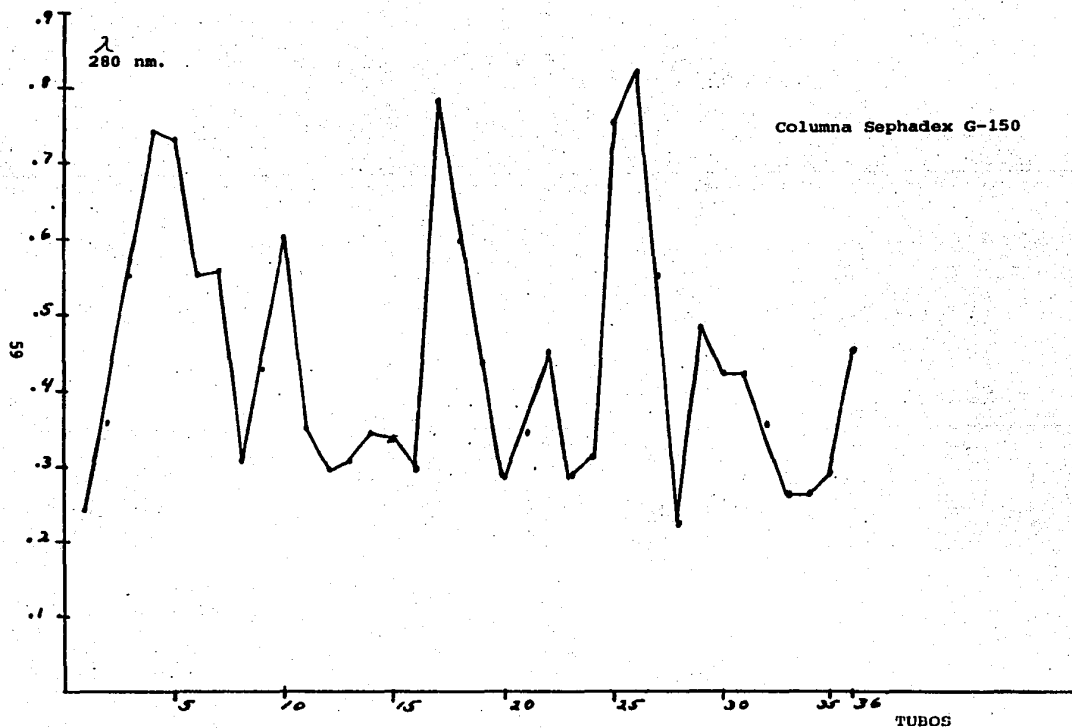
TUBO	VOLUMEN (ml)	$\lambda 230$	$\lambda 280$
18	1	1.300	0.590
19	1	0.550	0.395
20	1	0.290	0.285
21	1	0.390	0.340
22	1	0.675	0.450
23	1	0.310	0.280
24	1	0.315	0.310
25	1	1.050	0.750
26	1	0.970	0.820
27	1	0.610	0.545
28	1	0.200	0.225
29	1	1.150	0.480
30	1	0.680	0.420
31	1	0.565	0.420
32	1	0.560	0.350
33	1	0.430	0.265
34	1	0.345	0.260
35	1	0.340	0.282
36	1	0.650	0.455

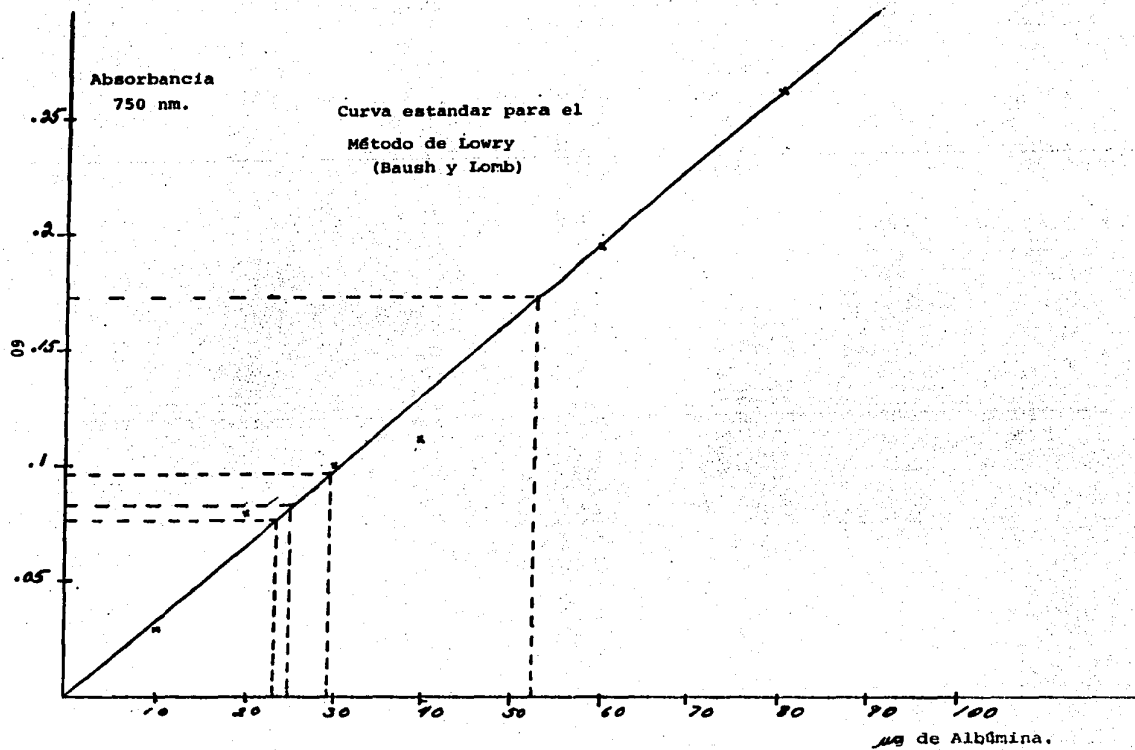
Columna Sephadex G-25

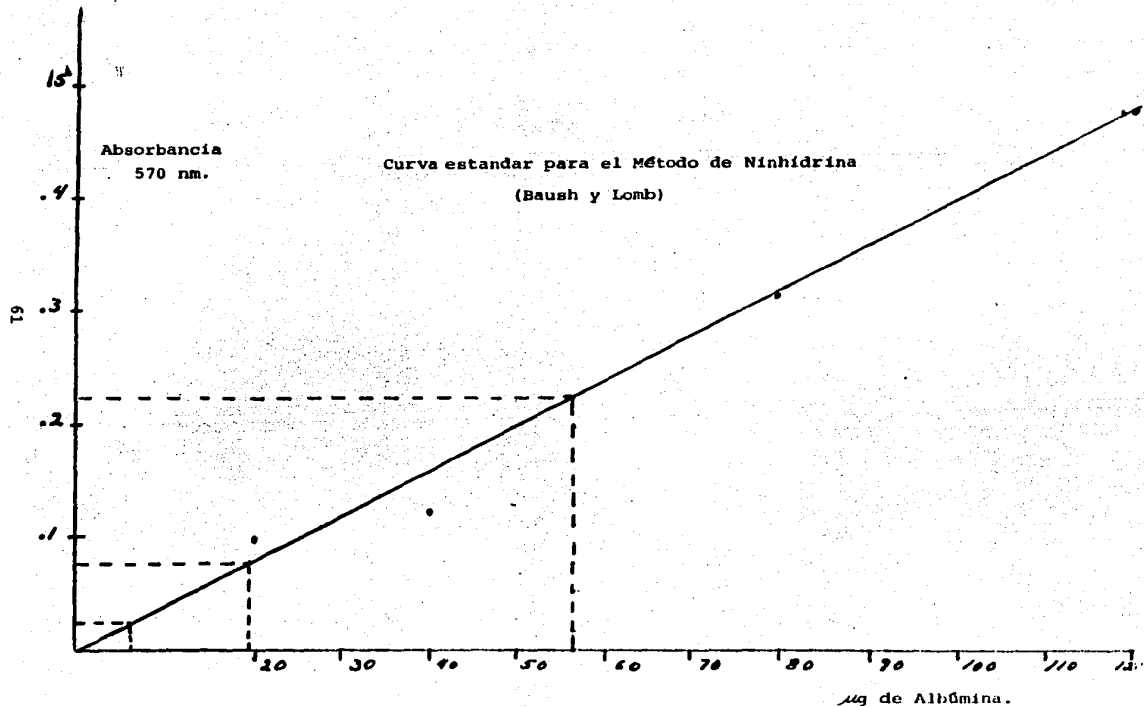












III. DISCUSION DE RESULTADOS

En este trabajo se ha descrito el aislamiento de un compuesto hasta ahora desconocido, a partir del látex de Sebastiana pavoniana que presenta toxicidad según las pruebas farmacológicas efectuadas con la fracción denominada Residuo 2. El efecto tóxico que se pudo observar fué de tipo curarisante ya que al inyectar la fracción activa a las ratas, se presenta una parálisis muscular en forma ascendente, es decir, empieza en las extremidades posteriores y avanza la parálisis hasta llegar al torax produciendo el paro respiratorio para llegar a la muerte .

Del Residuo 2 se intentó aislar lo que por algunas pruebas parece un alcaloide. La prueba de Dragendorff fué positiva siempre clara, se hizo después de aislar las fracciones por diferentes procedimientos para asegurar que la reacción positiva no era producida por un artefacto, sin embargo el análisis espectroscópico podría encausarse a una estructura que podría ser un alcaloide o un péptido como se indica en la parte experimental del trabajo .

La fracción A-6 muestra en IR las bandas 3300 cm^{-1} (ancha) típica de una asociación que puede venir de grupos OH y/o -NHR además de una banda a 1670 que puede asignarse a un grupo carbonilo conjugado, o bien de una amida .

Además del trabajo realizado para tratar de aislar un alcaloide se dirigió el esfuerzo para comprobar que también hay un péptido debido a la polaridad y pruebas cuyo resultado no se puede discutir en forma contraria. Estas reacciones son las de Lowry y Biuret y Ninhidrina con un resultado claramente positivo. Además se hicieron hidrolisis a presión y enzimáticas con lo que se establece que sin duda la fracción peptídica existe. La filtración con Sephadex G-25 , G-75, y G-150 indica que el péptido debe tener un peso molecular aproximado de 90 000 .

Los resultados aparentemente son difíciles de dirigir hacia un tipo definido especialmente porque no fué posible completar el estudio espectroscópico de la fracción A-6 ó A-7 .

Es necesario recordar que en la literatura (9-14) se han aislado compuestos tan interesantes como los alcaloides ciclopeptídicos obtenidos del género Zizyphus pertenecientes a la familia Rhamnaceae. De éstos se puede encontrar que la estructura de estos compuestos contiene grupos similares a los encontrados en éste trabajo.

El estudio de la estructura se hace después de hidrolizar el péptido en condiciones ácidas (HCl 6N) y a presión, obteniendo cantidades tan pequeñas del núcleo principal , que solo es posible deducir las estructuras con ayuda de la espectroscopía de masas . El residuo peptídico después de la hidrolisis, fué identificado por degradación y la reacción de ninhidrina en cromatografía de papel .

IV . . CONCLUSIONES

Sin el deseo de afirmar que el alcaloide presente en el látex de Sebastiania pavoniana sea similar, si puede decirse que es posible la relación con los alcaloides ciclopeptídicos, que explicaría el comportamiento de la fracción y la presencia de grupos funcionales que puede asignarse a ambos tipos de compuestos, alcaloide aromático y péptido .

Sería de gran importancia que se continuara el presente trabajo - para comprobar si efectivamente se tiene un alcaloide de estructura tan novedosa e interesante desde el punto de vista químico y - además insistir en la toxicidad que fué tan claramente demostrada. La estructura explicaría, si es la que arriba se indica, la solubilidad en agua y su uso como veneno de flecha, ya que según los reportes, los indígenas usaban el látex directamente .

V. B I B L I O G R A F I A

- 1 . - Hunken Leung C. Tesis Profesional .
"CONTRIBUCION AL ESTUDIO FITOQUIMICO DE VENENOS DE FLECHA
(SEBASTIANA PAVONIANA, EUPHORBIACEAE)"
México, D.F. (1981) .
- 2 . - Matai, C.K.; A.T.D. Gondwe y J.A. Kamau .
"Toxicity of Kiliambiti plant (Adenia volkensii): Identifi-
cation and estimation of toxic principle". American -
Journal of Veterinary Research . (1974) 35, 6, 829-830
- 3 . - Gschwendt, M. y E. Hecker. Tetrahedron Letters (1959) 3509
- 4 . - Johns, S.R. y J.A. Lamberton .
"New imidazole alkaloids from Glochidion species (Family
Euphorbiaceae) Australian Journal of Chemistry (1966)
20, 555-560 .
- 5 . - Tessier, A.M. ; A.Bouquet y R.R. Paris
"Sur quelques Euphorbiacées toxique Africaines". Plantes -
médicinales et phytothérapie (1975) IX, 3, 233-249 .

- 6 . - Stahl Egon .
"Drug Analysis by Chromatography and Microscopy"
1a. ed. ,An Arbor Science Publishers, Inc. U.S.A. (1973)
- 7 . - Youngken, Heber .
Pharmaceutical Botany. 7th. ed. Editorial Blabistan Corp.
New York, U.S.A. (1951) 752 .
- 8 . - Prestsch E., Clenc T., Seibl J., Simon W.
"Tablas para la elucidación de compuestos orgánicos por
métodos espectroscópicos"
1a. ed. , Ed. Alhambra , España (1980) .
- 9 . - Tschesche R. , Shah H.A. , Eckhardt G.
Phytochemistry (1979) 18, 702-704.
- 10 . - Tiwari K.P. , Masood M.
Phytochemistry (1979) 18, 704-705 .
- 11 . - Pandey V.B., Singh J.P., Seth K.K. , Eckhardt G.
Phytochemistry (1984) 23, 2118-2120.
- 12 . - Shah A.H. , Pandey V.B. , Eckhardt G., Tschesche R.
Phytochemistry (1984) 23, 931-933

13 . - Tschesche R., Wilhelm H., Ulrich E.
Liebigs Ann. Chem. 1974, 1694-1701 .

14 . - Tschesche R., David S.T., Uhlendorf J., Fehlhaber H.W.
Chem. Ber. 105, 3106-3114 (1972) .